

А.А. Карусевич, Д.В. Моисеев, Г.Н. Бузук

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
20-ГИДРОКСИЭКДИЗОНА В
ЛИСТЬЯХ ЛЕВЗЕИ
САФЛОРОВИДНОЙ МЕТОДОМ
ВЭЖХ**

Витебский государственный
медицинский университет

*Разработана методика определения 20-гидроксиэкдизона в водно-спиртовом экстракте листьев левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*) методом ВЭЖХ. Определение фитозкдистероида проводится на обращенно-фазовой колонке (Waters Spherisorb ODS-2 250x4,6 мм, 5 мкм) с изократическим режимом элюирования ПФ (вода и ацетонитрил 83:17 по объему). Градуировочный график*

зависимости площади пика вещества от содержания в пробе левзеи при концентрациях 1-500 мкг/мл.

ВВЕДЕНИЕ

20-гидроксиэкдизон (он же β-экдизон; в дальнейшем 20E) – соединение из комплекса полигидроксированных стероидов, получивших название «экдистероиды» [1,2].

Экдистероиды являются весьма распространенными стероидными соединениями (рис. 1). Они выявлены более чем у 90% членистоногих и беспозвоночных. В растительном мире они найдены более чем в 80 семействах [3]. Основное содержание при этом приходится на α-экдизон и 20E. Остальные экдистероиды принято называть минорными.

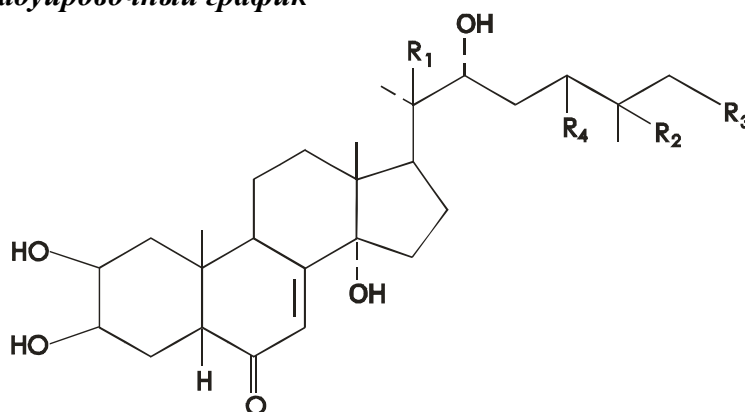


Рис. 1 – Общая структурная формула экдистероидов

К настоящему времени установлены структурные формулы примерно 150 экдистероидов, продуцируемых только лишь растительными организмами (хотя, учитывая комбинации индивидуальных модифи-

каций, теоретически можно ожидать более 1000 различных модификаций [4,5]).

Примеры самых распространенных из них приведены в табл.1.

Таблица 1 – Заместители в наиболее распространенных экдистероидах

Наименование	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
α-экдизон	-H	-OH	-H	-H
β-экдизон	-OH	-OH	-H	-H
Инокостерон	-OH	-H	-OH	-H
Макистерон А	-OH	-H	-OH	-CH ₃
Понастерон А	-OH	-H	-H	-H

Для количественного определения 20Е применяется как обращено-фазовый [8,9], так и нормально-фазовый вариант ВЭЖХ [5,10]. Описанные в литературе методики количественного определения 20Е относятся либо к определению его в корнях левзеи, либо в других видах растений [9,10]. Единственным источником, определенно указывающим на содержание 20Е в листьях левзеи, остается Вересковский В.В. [3], хотя суть метода количественного определения там не упоминается.

Целью настоящего исследования являлся подбор оптимальных условий хроматографического определения и разработка методики, позволяющей идентифицировать и определять 20Е в листьях левзеи методом ВЭЖХ с изократическим

элюированием. Мы посчитали также целесообразным снять спектр поглощения 20Е для данных условий хроматографирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на жидкостном хроматографе фирмы Agilent HP 1100, в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G1311А, диодно-матричным детектором G1315В, термостатом колонок G1316А, устройством для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G1313А. Сбор данных, обработка хроматограмм и спектров поглощения проводилась с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D.

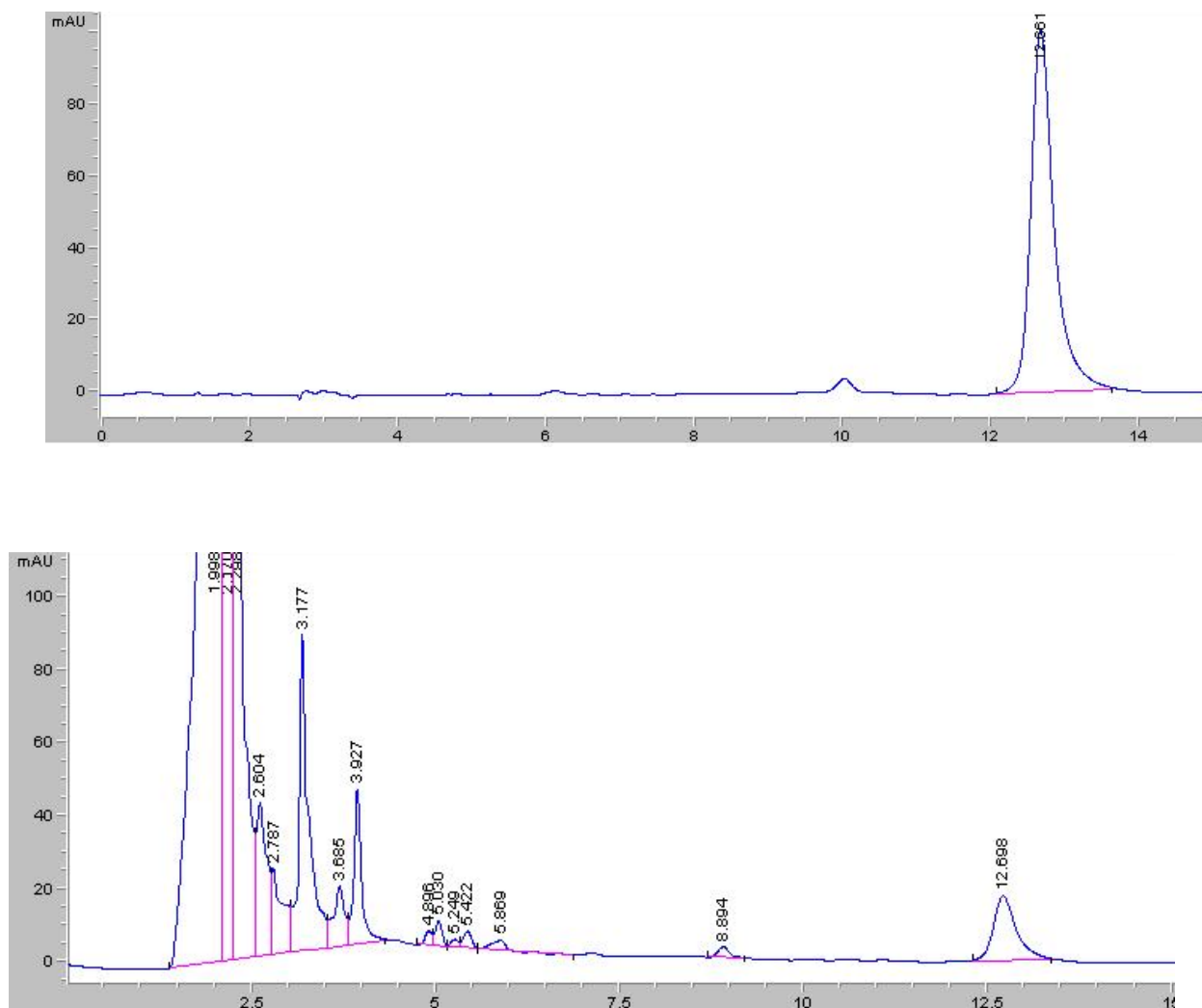


Рис.2 – Хроматограмма стандартного образца 20Е (вверху) и исследуемого образца листьев левзеи (внизу)

Разделение проводилось на хроматографической колонке Waters Spherisorb ODS-2 250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Подвижная фаза: вода и ацетонитрил 83:17 (по объему), объем пробы 10 мкл. Разделение проводилось при температуре колонки 30°C, давлении в системе около 120 bar. Детектирование осуществляли при длине волны 242 нм, спектр поглощения в области максимума пика 20Е записывали с по-

мощью фотодиодного детектора Diode-array detector Agilent HP 1100 G1315B и программы Agilent ChemStation for LC 3D. В качестве стандарта использовали образец 20Е (Sigma-Aldrich). Вещество считали идентифицированным при совпадении времени удерживания (рис. 2) и спектра поглощения (рис. 3) со стандартом.

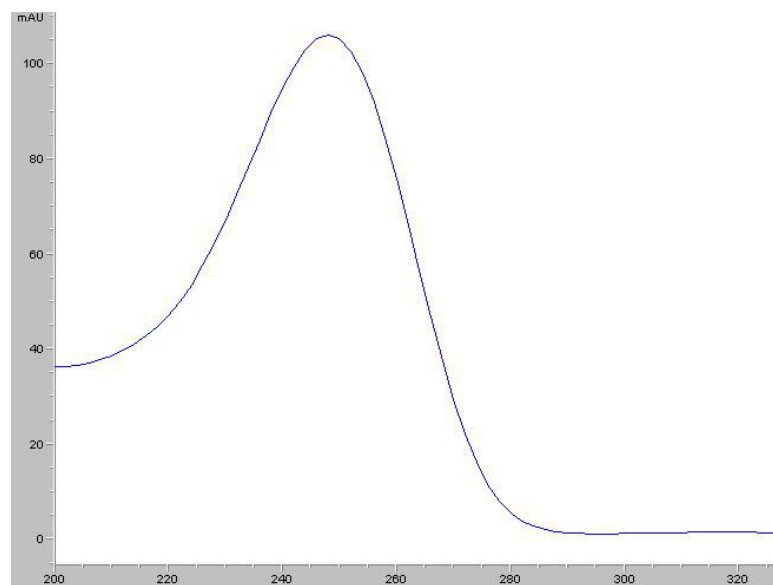


Рис.3 – Спектр поглощения спиртового раствора 20Е в ультрафиолетовой области.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий определения

При воспроизведении методики определения 20Е методом ВЭЖХ, описанной в литературе [8], оказалось, что коэффициент удерживания данного соединения на хроматографической колонке при описанных в методике параметрах системы составляет около 0,03, и, следовательно, вещество элюируется практически в мертвом объеме. Поэтому нами экспериментально

были подобраны условия хроматографического определения 20Е, при которых при наименьших затратах рабочего времени достигается приемлемое разрешение пиков 20Е и других веществ на хроматограмме. В табл.2 представлено влияние концентрации органического модификатора подвижной фазы (ПФ) на коэффициент удерживания 20Е, который рассчитывали по формуле: $k' = (t_R - t_0) / t_0$, где t_R – время удерживания вещества, а t_0 – мертвое время (при скорости подачи ПФ 0,5 мл/мин составляло 4,00 мин).

Таблица 2 – Зависимость коэффициента емкости колонки от концентрации ацетонитрила в ПФ (по объему).

Ацетонитрил, %	60	40	30	20	17	15
Коэффициент удерживания, k'	0,03	0,42	0,53	2,37	5,32	9,70

Для ускорения проведения анализов скорость подачи ПФ увеличили с 0,5 мл/мин до 1 мл/мин. Данные о разделении

пиков веществ и пика 20Е представлены в табл.3.

Таблица 3 – Основные хроматографические параметры разделения 20Е

Эффективность разделения (N)	Коэффициент асимметрии пика (A_s)	Селективность разделения (α)	Коэффициент разрешения пиков (R_s)	Коэффициент удерживания (k')
~ 10500	0,7	> 1,3	> 2,0	5,32

Расчет количественного содержания 20е. Градуировочный график строили по зависимости площади пика 20Е на хроматограмме от содержания вещества во вводимой пробе. Уравнение прямолинейной зависимости (при концентрациях 20Е от 1 до 500 мкг/мл) имеет вид $S=4,511 \times C$, $R^2=0,9986$.

Пробоподготовка. В литературе описаны различные методики подготовки проб, содержащих 20Е, для высокоэффективной жидкостной хроматографии [8,5,9,10,11]. Чаще всего это экстракция водно-метанольными или водно-этанольными растворами с последующей очисткой полученного экстракта либо при помощи малополярных органических растворителей [8,11], либо при помощи концентрирующих патронов с сорбентом C_{16} [9,6,5,10]. В качестве малополярных растворителей чаще всего используется хлороформ.

При разработке методики подготовки пробы для хроматографирования мы исходили из предположения, что любая дополнительная операция с образцами влечет за собой потерю части 20Е. Поэтому пробы получали по разработанной нами методике [12] без дополнительных стадий очистки.

МЕТОДИКА

Около 10 г сухих листьев (точная навеска) левзеи сафлоровидной помещали в коническую колбу вместимостью 200 мл, прибавляли 100 мл 70% этанола и настаивали при периодическом перемешивании в течение суток. Затем содержимое колбы отфильтровывали через хлопчатобумажную ткань в коническую колбу вместимостью 200 мл, фильтровали через фильтр с

диаметром пор 0,45 мкм и инжестировали в хроматограф.

Приготовление раствора рабочего стандартного образца (PCO): около 0,0050 г (точная навеска) 20-гидроксиэкидона (производства (Sigma-Aldrich) взвешивали в мерной колбе на 50,0 мл, затем доводили до метки этанолом, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и инжестировали в хроматограф.

Для анализируемого раствора и PCO получали не менее 5 хроматограмм, площадь пиков и другие параметры рассчитывали как среднее значение пяти определений.

Концентрацию 20Е в левзеи сафлоровидной вычисляли по следующей формуле:

$$C, \% = \frac{S_{иссл} \times M_{станд}}{S_{станд} \times M_{иссл}} \times 100\%,$$

где $C, \%$ - количественное содержание 20Е,

S – площади пиков PCO и исследуемого образца,

M – массы навесок PCO и исследуемого образца в граммах.

ВЫВОДЫ

Таким образом, нами разработана методика ВЭЖХ-определения главного действующего вещества (20-гидроксиэкидона) в листьях левзеи сафлоровидной. Продолжительность одного определения без учета пробоподготовки составляет около 20 минут. Методика может быть применена для стандартизации лекарственного растительного сырья лев-

зеи сафлоровидной и лекарственных средств на ее основе.

Содержание 20Е в листьях левзеи сафлоровидной, определенное по предлагаемой нами методике, составляло 0,13-0,82% от общей массы сухого сырья, в зависимости от времени сбора.

SUMMARY

A.A. Karusevich, D.V. Moiseev, G.N. Buzuk
IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE
DETERMINATION OF 20-
HYDROXYECDYZONE IN THE LEAVES
OF RHAPONTICUM CARTHAMOIDES
HAS BEEN ELABORATED BY THE
METHOD OF HIGH-PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY

The determination of 20-hydroxyecdyzone in the leaves of *Rhaponticum carthamoides* has been elaborated by the method of high-performance liquid chromatography. The determination of phytoecdysteroid has been performed of the inverted – phase column (Waters Spherisorb ODS-2 250×4, 6 mm, 5µm) with isocratic regime of MP eluirovation (water and acetonitril 83:17 according to the volume). Gradual schedule of the dependence of the area of the substance peak on the content in the sample is lined in concentration 1-500 µg/ml

ЛИТЕРАТУРА

1. Фитоэктистероиды / Л.И. Алексеева [и др.]; под общ. ред. В.В. Володина. - СПб.: Наука, 2003. – 293 с.
2. Фитоэктистероиды – растительные аналоги гормонов линьки насекомых / В.В. Володин [и др.] // Растительные ресурсы. – 2004. – Вып.2 - С. 1-18.
3. Вересковский, В.В. Левзея-перспективное лекарственное, пищевое и кормовое растение / В.В. Вересковский, Минск: Наука и техника, 1992. - 64 с.
4. Тимофеев, Н.П. Накопление и сохранность 20-гидроксиэктистерона в лекарственном сырье левзеи / Н.П. Тимофеев // Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными растительными ресурсами создание функциональных продуктов. Мат. докл. 1-ой Рос. научно-практ. конф. [Электронный ресурс]. - 2006. – Режим

доступа: http://www.leuzea.ru/левзея_сафлоровидная_новейший_эктистероид_содержащий_продукт_-_Leuzea-Rhaponticum_carthamoides_New_ecdysteroid_containing_product.htm. – Дата доступа: 16.07.2006.

5. Куренкова, С.В. Продуктивность и химический состав *Rhaponticum carthamoides* (Willd.), выращиваемого в республике Коми / С.В. Куренкова, Г.Н. Табаленкова // Растительные ресурсы. - 2000. - №2. - С. 14-23.

6. Рапонтикум сафлоровидный – *Rhaponticum carthamoides* // Лекарственные растения Государственной фармакопеи. Лекарственные растения, разрешенные для производства ГЛС. - М. - 2001. – С. 369-373.

7. Пчеленко, Л.Д. Адаптогенный эффект эктистероидсодержащей фракции *Serratula coronata* L. / Л.Д. Пчеленко, Л.Г. Метелкина, С.О. Володина // Химия растительного сырья. – 2002. - №1. - С. 69-80.

8. Зарембо, Е.В. Содержание 20-гидроксиэктистерона в видах родов *Raponticum* Ludw. и *Serratula* L. флоры Дальнего Востока России / Е.В. Зарембо, Л.И. Соколова, П.Г. Горовой // Растительные ресурсы. - 2001. - №3. - С. 59-64.

9. Алексеева, Л.И. Метод концентрирования минорных гидрофобных эктистероидов с использованием фронтальной хроматографии / Л.И. Алексеева, В.В. Володин, В.Г. Лукша // Растительные ресурсы. - 2000. - №4. - С. 122-127.

10. Филиппова, В.Н. Эктистероиды в культурах клеток *Serratula coronata* и *Ajuga reptans* / В.Н. Филиппова [и др.] // Химия растительного сырья. - 2002. - №1. - С. 57-62.

11. Маматханов, А.У. Получение эктистерона / А.У. Маматханов, М.-Р. Шамсутдинов, Т.Т. Шакиров // Химия природных соединений. - 1983. - №5. - С. 90-92.

12. Карусевич, А.А. Выделение и очистка эктистероидов из листьев левзеи сафлоровидной / А.А. Карусевич, Г.Н. Бузук // Вестник ВГМУ. - 2005. - т.4. - №3. - С. 87-91.

Поступила 26.07.2007г
